

玉米逆境响应转录因子 *ZmGBF1* 的克隆及表达分析

朱叶青, 沈艺, 柯珂, 牟春霓, 刘卫娟, 邹华文\* (长江大学农学院, 湖北荆州 434025)

**摘要** 从玉米中克隆了 *ZmGBF1* 基因, 该基因长 1 134 bp, 编码 377 个氨基酸。进化树分析表明, 玉米 *ZmGBF1* 与小麦 *TaGBF1*、*TuGBF3* 和高粱 *SbCPRF1* 亲缘关系最近。实时荧光定量 PCR 分析表明, *ZmGBF1* 在玉米胚芽鞘中表达量最高, 叶片次之, 根中表达量最低; *ZmGBF1* 基因表达受到盐、干旱、高温、低温、脱落酸和水杨酸诱导, 且在干旱和高温条件下 *ZmGBF1* 的表达量与对照相比呈显著差异, 暗示 *ZmGBF1* 可能参与玉米对干旱和高温的响应过程。

**关键词** 玉米; *ZmGBF1*; 非生物胁迫; 表达分析

中图分类号 S 513 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)09-0104-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.09.025

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Cloning and Expression Analysis of Stress Response Transcription Factor *ZmGBF1* Gene in Maize

ZHU Ye-qing, SHEN Yi, KE Ke et al (College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025)

**Abstract** *ZmGBF1* gene was cloned from maize. The cDNA of *ZmGBF1* contains 1 134 base pairs and encodes 377 amino acids. The phylogenetic tree analysis showed the *ZmGBF1* was closely related to wheat *TaGBF1*, *TuGBF3* and sorghum *SbCPRF1*. Real-time quantitative PCR analysis showed that *ZmGBF1* expression was the highest in coleoptile, followed by leaf and lowest in root. Furthermore, *ZmGBF1* was induced by salt, drought, high temperature, low temperature, abscisic acid and salicylic acid. The expression level of *ZmGBF1* under drought and high temperature was significantly different with that of the control, strongly suggesting that *ZmGBF1* might be involved in the responses to drought and high temperature in maize.

**Key words** *Zea mays* L.; *ZmGBF1*; Abiotic stress; Expression analysis

植物在生长发育过程中经常遭受病虫害等生物胁迫以及干旱、高盐、极端温度等非生物胁迫。当遭受逆境胁迫时, 植物可以从形态结构及生理生化机制等方面发生一系列的改变, 以达到适应和抵御逆境胁迫的目的<sup>[1]</sup>。在上述响应过程中, 转录因子起着重要作用。作为重要的调控因子, 转录因子可以接受上游信号, 并通过其蛋白质结构上特殊的 DNA 结合区与靶基因上游的顺式作用元件区域结合, 进而激活或者抑制靶基因的表达。这种转录水平上的调控在植物逆境响应信号网络中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。在植物中有 10% 的基因编码转录因子, 它们分别在植物不同发育阶段、不同环境条件下发挥调控作用<sup>[3]</sup>。在植物中至少有 60 个转录因子家族, 但是只有少数家族成员如 *bZIP*、*NAC*、*MYB*、*WRKY* 和 *AP2/ERF* 等被证实参与生物及非生物逆境响应<sup>[4]</sup>。

利用 MEME (multiple em for motif elicitation) 分析工具, Foster 等<sup>[5]</sup>根据 *bZIP* 转录因子序列相似性将拟南芥 75 个 *bZIPs* 分为 A、B、C、D、E、F、G、H、I 和 S 类 10 个亚家族。GBF 转录因子作为 *bZIP* 家族 G 组成员, 已被证明与几个环境调节基因启动子区的 G-box 序列特异性结合<sup>[6-7]</sup>, 其特征在于它们的 C-末端碱性/亮氨酸拉链(*bZIP*) DNA 结合结构域和 N-末端富含脯氨酸的转录激活结构域<sup>[8]</sup>。大量研究表明, GBF 类转录因子广泛参与植物的各种发育进程以及对外界生物和非生物胁迫的响应。有研究发现, 该类基因受光调控诱导, 如拟南芥 *GBF1*、*GBF2*、*GBF3* 是调节光诱导的

*RBCS-1A* 基因启动子的 G-box 结合蛋白<sup>[7,9]</sup>; 欧芹中 *CPRF-1* 能与 *CHS* 基因启动子的 G-box 结合, 调节 *CHS* 基因的光诱导表达<sup>[10]</sup>; 小麦 *TaGBF2* 基因介导了蓝光响应信号通路<sup>[11]</sup>。此外, GBF 类转录因子还与抗逆响应有关, 如小麦 *TaGBF2*、水稻 *OSBZ8*、水稻 *GBF4*、草莓 *bZIP* 基因可以响应干旱调控的诱导<sup>[11-14]</sup>; 过表达 *EcGBF3*、*AtGBF3* 拟南芥植株降低了对 ABA 的敏感性, 提高了对渗透胁迫、盐分和干旱胁迫的耐受性<sup>[15]</sup>; 250 mmol/L NaCl 模拟盐胁迫 24 h 后, 2 种不同籼稻基因型 *Rasi* 和 *Tellahamsa* 中 *OsGBF1* 的表达均有不同程度的上调表达<sup>[16]</sup>; 拟南芥中 *GBF1* 通过调节 *CAT2* 表达和细胞内  $H_2O_2$  含量参与植株衰老过程的调节<sup>[17]</sup>。

前期工作中, 笔者通过 Bulked-RNAseq 分析了玉米不同干旱响应类型的自交系, 结果发现 *ZmGBF1* (*GRMZM2G011932*) 基因强烈响应干旱信号, 暗示其可能在玉米干旱信号转导过程中起重要作用<sup>[18]</sup>。为深入探究基因 *ZmGBF1* 的功能, 该研究首先对 *ZmGBF1* 进行生物信息学分析, 同时运用 qRT-PCR 技术分析该基因在高温、低温、盐、干旱、脱落酸以及水杨酸处理下的表达特性, 以期为深入研究玉米基因 *ZmGBF1* 的生物学功能奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 试验材料及处理** 以玉米自交系 B73 为试验材料, 选取大小一致的种子, 1% 次氯酸钠消毒 5 min, 蒸馏水冲洗 3 次, 种子置于 28 °C 培养箱进行催芽。将发芽一致的种子放入 1/4 Hoagland 培养液中培养, 每 7 d 更换 2 次培养液, 培养至三叶期进行处理。采用 20% PEG6000 模拟干旱处理, 用 0.2 mol/L NaCl 溶液进行盐处理, 对照组均为正常培养, 处理 48 h 后取样; 对于低温处理, 将幼苗转移至 4 °C 光照培养箱; 高温处理将幼苗转移至 42 °C 光照培养箱, 对照组均为正常培养, 处理 4 h 后进行取样; 激素处理采用 0.1 mmol/L 的

**基金项目** 湖北省教育厅科学研究计划资助项目(Q20201301)。  
**作者简介** 朱叶青(1996—), 女, 河南郑州人, 硕士研究生, 研究方向: 玉米逆境分子生物学。\* 通信作者, 教授, 博士生导师, 从事玉米逆境分子生物学研究。  
**收稿日期** 2022-01-06

ABA、SA 进行叶面均匀喷施,每隔 12 h 喷施 1 次,对照组等效喷施蒸馏水,处理 48 h 后取样。每处理设置 3 个生物学重复,取样部位为幼苗的根、胚芽鞘、叶,液氮速冻后保存于超低温冰箱中。

**1.2 玉米总 RNA 的提取及 cDNA 的合成** 样品材料在液氮低温研磨后,参照宝日生物技术(北京)有限公司 TRIzol 试剂产品说明方法进行总 RNA 的提取,用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行质量检测。残留 DNA 的去除以及 cDNA 合成按照全式金公司试剂盒(TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix)说明书进行。cDNA 测定浓度后保存于 -20 °C 待用。

利用 Primer 5.0 分别设计引物,通过 RT-PCR 方法获得 *ZmGBF1* 基因片段。PCR 体系为 10  $\mu$ L: cDNA (总 DNA)

0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 1.3  $\mu$ L, 2 $\times$  buffer 5.0  $\mu$ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2.0  $\mu$ L, 上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ L, *Taq* 酶 [5 U/(mol $\cdot$ L)] 0.2  $\mu$ L。PCR 反应条件为 94 °C 2 min, 98 °C 10 s, 62 °C 30 s, 68 °C 1 min, 35 个循环, 68 °C 4 min。

**1.3 玉米 *ZmGBF1* 基因表达量分析** 采用 qRT-PCR 技术分析玉米 *ZmGBF1* 基因的相对表达量,选取玉米 GAPDH 基因为内参基因, *ZmGBF1* 基因及内参基因的上下游引物序列通过 Primer 5.0 软件设计(表 1)。试验所使用的 SYBR Green I 荧光标记染料是购于生工公司的 SGEExcel FastSYBR qPCR 预混液,荧光定量 PCR 仪型号为 AriaMx。反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 5 s, 60 °C 20 s; 40 个循环。每个样品设置 3 个技术重复,采用 2<sup>- $\Delta\Delta Ct$</sup>  法计算相对表达量水平。

表 1 引物序列及用途

Table 1 Primers sequence and application

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	用途 Description
<i>ZmGBF1</i> -qPCR-F	GTACTCCAGTTTAGGCACTGAT	Primers for RT-PCR
<i>ZmGBF1</i> -qPCR-R	TACGTTACAACCTCTGGGTACAC	Primers for RT-PCR
<i>GAPDH</i> -qPCR-F	CCATCACTGCCACACAGAAAAC	Reference gene primers
<i>GAPDH</i> -qPCR-R	AGGAACACGGAAGGACATACCAG	Reference gene primers

**1.4 玉米 *ZmGBF1* 基因的生物信息学分析** 在线工具 Ex-pasy ProtParam<sup>[19]</sup> (<https://web.expasy.org/protparam/>) 用于对 *ZmGBF1* 蛋白特性进行预测分析,使用 DNAMAN 9.0 软件进行序列比对,使用 MEGA-X<sup>[20]</sup> 软件进行进化树的构建,使用在线工具 InterProScan<sup>[21]</sup> (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) 分析 *ZmGBF1* 蛋白结构域,蛋白二级结构预测分析则采用在线工具 SOPMA ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)), TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 用于跨膜结构分析,ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 用于分析 *ZmGBF1* 蛋白的亲疏水性,NetPhos 3.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetPhos-3.1/>) 则用于进行磷酸化位点预测分析。

## 2 结果与分析

**2.1 玉米 *ZmGBF1* 蛋白的基因克隆及序列分析** 分析 RT-PCR 产物测序后的结果,在 NCBI 中比对结果表明,该序列与其他物种的 GBF 序列相似性最高,于是命名该序列为 *ZmGBF1*,并在 NCBI 中登录,登录号为 JX469957.1。进一步分析表明,该序列含有 1 个长度为 1 134 bp 的开放阅读框,上游有 1 个起始密码子 ATG,下游有 1 个终止密码子 TGA,表明该序列是 1 个全长的基因。

ProtParam 在线分析显示, *ZmGBF1* 编码 377 个氨基酸,其分子式为 C<sub>1728</sub>H<sub>2762</sub>N<sub>502</sub>O<sub>573</sub>S<sub>12</sub>,分子质量 40 122.68,等电点为 7.11,消光系数 26 025,不稳定系数 64.81 (>40),为不稳定蛋白,总平均亲水性 -0.678,属于亲水性蛋白(图 1a)。InterProScan 在线分析显示, *ZmGBF1* 含有 MFMR 和 bZip-plant-GBF1 结构域,分别位于氨基酸 1~92 和 249~297 位置。

NetPhos 3.1 在线分析显示, *ZmGBF1* 中有 39 个 Ser 磷酸化位点,17 个 Thr 磷酸化位点(图 1b)。SOPMA 在线分析显示, *ZmGBF1* 的二级结构中含有的  $\alpha$  螺旋约占 28.65%,  $\beta$  转角约占 1.59%,延伸链约占 4.51%,其余的 246 个氨基酸为无规则卷曲(图 1c)。

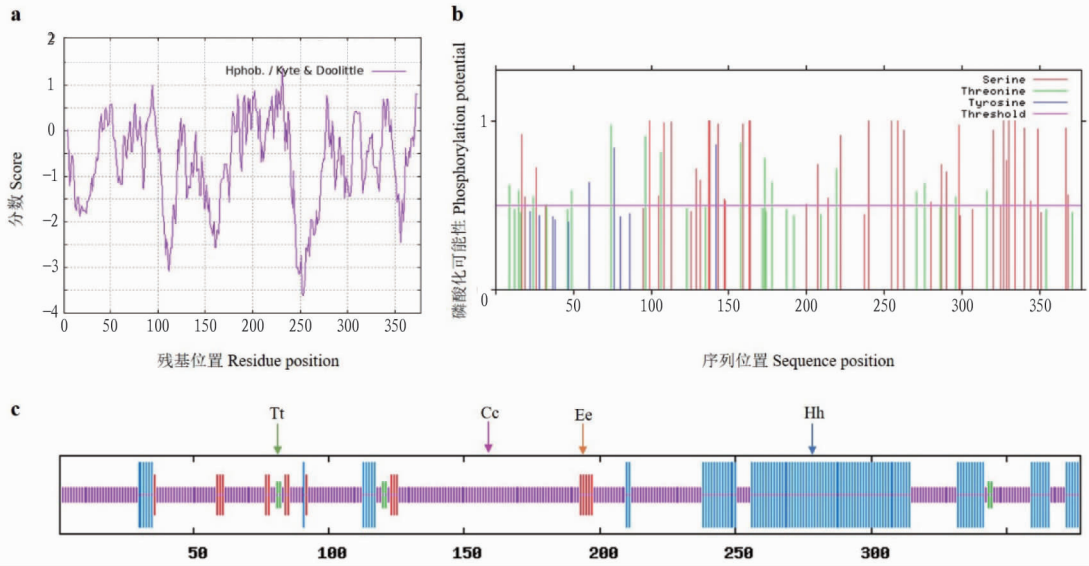
**2.2 玉米 *ZmGBF1* 的蛋白同源性及进化树分析** 从 GenBank 网站下载了来自玉米和其他植物中若干个 *ZmGBF1* 同源蛋白和非生物胁迫相关的 GBF 转录因子的氨基酸序列。NCBI 蛋白序列比对结果表明, *ZmGBF1* 编码的氨基酸序列与高粱 (*Sorghum bicolor*) CPRF1、普通小麦 (*Triticum aestivum*) GBF1 以及乌拉尔图小麦 (*Triticum urartu*) GBF3 序列相似度较高,相似性分别达 87.96%、69.37% 和 64.66%。用 DNAMAN 软件将 *ZmGBF1* 蛋白序列与其他物种进行蛋白同源性比对分析(图 2),结果显示,在小麦、水稻、拟南芥、藜麦以及穆子中都存在类似结构,其序列中都含有保守的 GBF1 结构域,暗示它们具有相似的功能。

图 3 表示 *ZmGBF1* 与其他物种同源蛋白序列(包括拟南芥中的 AtGBF1、AtGBF2 和 AtGBF3;水稻中的 OsGBF1 和 Os-BZ8;高粱中的 SbCPRF1;玉米中的 *ZmGBF3*;小麦中的 TuGBF3 和 TaGBF1 等)构建的进化树,结果显示, *ZmGBF1* 与小麦 TaGBF1、TuGBF3 和高粱 SbCPRF1 亲缘关系最近。

**2.3 玉米 *ZmGBF1* 在不同处理下的表达谱分析** 利用 qRT-PCR 技术分析 *ZmGBF1* 在正常条件下不同部位中的表达情况。如图 4a 所示, *ZmGBF1* 基因的相对表达量在胚芽鞘中最高,其次是叶片,在根中的基础表达则最低。差异分析表明, *ZmGBF1* 基因在胚芽鞘的表达与根部具有显著差异,初步推断 *ZmGBF1* 基因参与调控表达的部位以胚芽鞘为主。

根中 *ZmGBF1* 基因表达受到盐、干旱、高温、低温、脱落酸和水杨酸诱导,根部位的检测结果如图 4b 所示,根中 *ZmGBF1* 基因在盐、干旱、高温、低温、脱落酸和水杨酸处理下表达量

均高于对照,在干旱和高温条件下 *ZmGBF1* 的表达量与 CK 相比呈显著差异,说明 *ZmGBF1* 在玉米高温和干旱响应中发挥重要作用。



注:a.亲水性/疏水性分析;b.磷酸化位点分析;c.二级结构预测,Tt:β转角;Cc:无规则卷曲;Ee:延伸链;Hh:α螺旋

Note:a. Analysis of hydrophilic and hydrophobic amino acid;b. Phosphorylation sites analysis;c. Prediction of secondary, Tt. Beta turn; Cc. Random coil; Ee. Extended strand; Hh. Alpha helix

图1 *ZmGBF1* 蛋白的生物信息学分析

Fig.1 Bioinformatics analysis of *ZmGBF1* protein

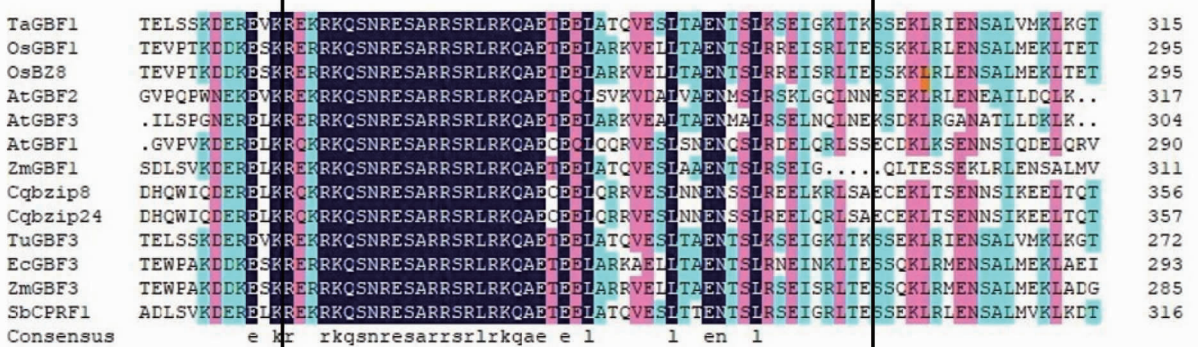


图2 *ZmGBF1* 的氨基酸序列与其他序列的多重比对

Fig.2 Multiple alignment of the amino acid sequence of *ZmGBF1* with other plants

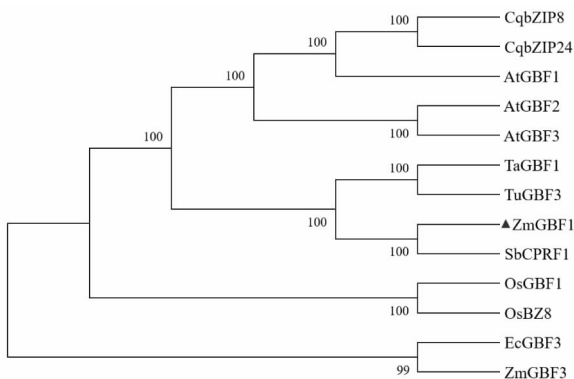


图3 *ZmGBF1* 蛋白与其他物种同源基因的进化树分析

Fig.3 Phylogenetic tree analysis of *ZmGBF1* protein and homologous genes of other species

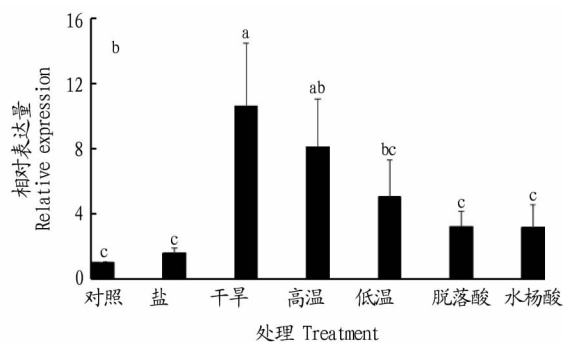
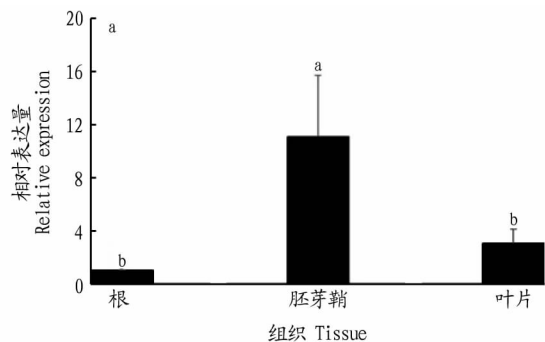
### 3 结论与讨论

该研究从玉米中克隆并鉴定出1个bZIP家族成员的cDNA,命名为*ZmGBF1*。通过NCBI-BLAST的同源性比对,发现其氨基酸序列与植物bZIP家族的G组成员具有最高相似性。分别从其他模式植物中选取GBF序列与*ZmGBF1*进行多序列比对,结果发现这些序列都含有一个保守的bZip-plant-GBF1结构域,表明*ZmGBF1*属于典型的bZIP家族的成员,并且和其他成员一样行使相同或相似的生物学功能。进化树分析结果表明,玉米*ZmGBF1*与小麦TaGBF1、TuGBF3和高粱SbCPRF1亲缘关系最近。

在不同组织中*ZmGBF1*的表达量不同,暗示*ZmGBF1*可能参与了植物生长发育的调控。*ZmGBF1*在胚芽鞘中表达量最高,其次是叶片,在根中最低。*ZmGBF1*基因不但可以

被干旱和高盐等非生物胁迫因子诱导,还可以被生物胁迫因子信号分子脱落酸和水杨酸诱导表达,表明其可能同时参与生物

逆境和非生物逆境的信号转导过程。至于其在逆境信号传导及植物发育中的确切作用还需要进一步研究。



注:柱上不同小写字母表示各处理在 0.05 水平差异显著

Note: Different lowercase letters on different columns indicate significant differences at 0.05 level

图 4 不同处理条件下 *ZmGBF1* 在玉米根中的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of *ZmGBF1* at roots under differential treatments

## 参考文献

- [1] GUPTA A, RICO-MEDINA A, CAÑO-DELGADO A I. The physiology of plant responses to drought[J]. *Science*, 2020, 368(6488): 266–269.
- [2] NG D W K, ABEYSINGHE J K, KAMALI M. Regulating the regulators: The control of transcription factors in plant defense signaling[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12): 1–18.
- [3] BAILLO E H, KIMOTHO R N, ZHANG Z B, et al. Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement[J]. *Genes*, 2019, 10(10): 1–23.
- [4] AMORIM L L B, DOS SANTOS R D F, NETO J P B, et al. Transcription factors involved in plant resistance to pathogens[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2017, 18(4): 335–351.
- [5] FOSTER R, IZAWA T, CHUA N H. Plant bZIP proteins gather at ACGT elements[J]. *FASEB J*, 1994, 8(2): 192–200.
- [6] SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI Y. Gene expression and signal transduction in water-stress response[J]. *Plant Physiol*, 1997, 115(2): 327–334.
- [7] MENKENS A E, SCHINDLER U, CASHMORE A R. The G-box: A ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins[J]. *Trends Biochem Sci*, 1995, 20(12): 506–510.
- [8] JAKOBY M, WEISSHAAR B, DRÖGE-LASER W, et al. BZIP transcription factors in *Arabidopsis*[J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(3): 106–111.
- [9] 萨其拉, 李文彬, 孙勇如. G-box 和 G-box 结合蛋白在植物基因诱导表达中的转录调控作用[J]. *植物生理学通讯*, 2003, 39(1): 89–92.
- [10] WELLMER F, SCHÄFER E, HARTER K. The DNA binding properties of the parsley bZIP transcription factor CPRF4a are regulated by light[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(9): 6274–6279.
- [11] 贾月盼. 小麦 bZIP 转录因子 TaGBF2 的功能研究[D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [12] BASU S, ROYCHOUDHURY A. Expression profiling of abiotic stress-inducible genes in response to multiple stresses in rice (*Oryza sativa* L.) varieties with contrasting level of stress tolerance[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 1–12.
- [13] SELAMAT N, NADARAJAH K K. Meta-analysis of quantitative traits loci (QTL) identified in drought response in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plants (Basel)*, 2021, 10(4): 1–26.
- [14] 王小龙. 草莓 bZIP 基因的进化及对干旱胁迫的响应分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
- [15] RAMEGOWDA V, GILL U S, SIVALINGAM P N, et al. GBF3 transcription factor imparts drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1–13.
- [16] ASHWINI N, SAJEEVAN R S, UDAYAKUMAR M, et al. Identification of splice variant of *OsGBF1* in *Oryza sativa* ssp. *indica* genotypes under salinity stress[J]. *3 Biotech*, 2018, 8(8): 345.
- [17] SMYKOWSKI A, ZIMMERMANN P, ZENTGRAF U. G-Box binding factor1 reduces CATALASE2 expression and regulates the onset of leaf senescence in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(3): 1321–1331.
- [18] ZHOU K M, ZENG X, ZHANG B L, et al. Bulk segregant transcriptome analysis based differential expression of drought response genes in maize [J]. *Pak J Agr Sci*, 2020, 57(4): 909–923.
- [19] ARTIMO P, JONNALAGEDDA M, ARNOLD K, et al. ExpASY: SIB bioinformatics resource portal[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: W597–W603.
- [20] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Mol Biol and Evol*, 2018, 35(6): 1547–1549.
- [21] QUEVILLON E, SILVENTOINEN V, PILLAI S, et al. InterProScan: Protein domains identifier[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: W116–W120.